

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

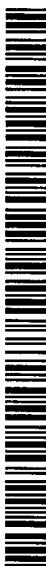


(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Januar 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/08751 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/50**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/02723
- (22) Internationales Anmeldedatum:
17. Juli 2001 (17.07.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 35 433.5 20. Juli 2000 (20.07.2000) DE
- (71) Anmelder und
- (72) Erfinder: **TUMA, Wolfgang** [DE/DE]; Munscheidstr. 14, 45886 Gelsenkirchen (DE). **BÜNGER, Gerd** [DE/DE]; Munscheidstr. 14, 45886 Gelsenkirchen (DE). **PITONE, Michael** [DE/DE]; Munscheidstr. 14, 45886 Gelsenkirchen (DE). **BURRICHTER, Heinrich** [DE/DE]; Munscheidstr. 14, 45886 Gelsenkirchen (DE).
- (74) Anwalt: **GEHRKE, Peter, P.**; Hölscherstrasse 4, 45894 Gelsenkirchen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).



Veröffentlicht:

- ohne internationalem Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MILD ENRICHMENT OF FOETAL CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: SCHONENDE HOCHANREICHERUNG VON FETALEN ZELLEN AUS PERIPHEREM BLUT UND VERWENDUNG DERSELBEN

WO 02/08751 A2

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for highly enriching foetal cells as products, whereby after a sample of maternal blood is taken and the centrifugation of blood fractions occurs, a cocktail of anti-bodies is added comprising anti-bodies anti-w, anti-bodies Anti-r, which bond specifically to transferrin-receptor-molecules as antigens of the surfaces of precursor of red blood cells containing a nucleus, and/or anti-bodies Anti-I, which bond specifically to antigen-I as antigens of the surfaces of precursor cells of red blood cells containing a nucleus and/or anti-bodies Anti I plus, which bond specifically to an intracellular structure of precursor foetal cells and/or the intracellular molecules of precursor foetal cells and/or membrane fragments of precursor foetal cells, and then the foetal cells which have been enriched 10^5 - 10^7 times are separated from the cell base.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur hohen Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus, wobei nach einer Entnahme von mütterlichem Blut die Blutfraction und Zentrifugation ein Antikörper-Cocktail mit Antikörper Anti-w, Antikörper Anti-r, die an Transferrin-Rezeptor-Moleküle als Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden, und Antikörper Anti-i, die an Antigen-i als Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden und/oder Antikörper Anti i plus, die an intrzellulären Strukturen von fetalen Vorläuferzellen und/oder der intrzellulären Moleküle von fetalen Vorläuferzellen und/oder Membranbruchstücken von fetalen Vorläuferzellen spezifisch binden, zugegeben und aus dem Zell-Ansatz fetalen Zellen mit 10^5 bis 10^7 -facher Anreicherung abgetrennt werden.

Beschreibung

5

Schonende Hochanreicherung von fetalen Zellen aus peripherem Blut und Verwendung derselben

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als
10 Erzeugnis aus, vorzugsweise peripherem, mütterlichem, Blut, wobei im Schritt a) nach einer Entnahme von mütterlichem Blut in Gegenwart von einer ein oder mehrere Antikoagulationen enthaltenden Lösung zur Bereitstellung einer Blutfaktion das Blut mit einer isotonischen Lösung verdünnt sowie im Schritt b) die Blutfaktion zwecks Anreicherung einer Zellfraktion mit zellkernhaltigen fetalen Zellen zentrifugiert werden, die Verwendung der Erzeugnisse zur Behandlung von Krankheiten und zur Bestimmung von Gen- und / oder Genomanalysen.

Im Stand der Technik sind Verfahren bekannt, die der Isolierung von fetalen Zellen dienen. Diese werden anschließend analysiert auf Genomdefekte, Erb-
20 krankheiten oder dergleichen. Die Isolierung der fetalen Zellen aus dem peripheren Blut der Mutter ist erwünscht, um unerwünschte schwere Nachteile herkömmlicher Verfahren zur möglichst frühzeitigen Erkennung vorhandener Krankheiten oder Entwicklungsstörungen zu vermeiden zu verhelfen, da die auf Grundlage von Amniocentese oder Chorionzottenbiopsie beruhenden herkömmlichen Methoden
25 das Risiko des Abortus und Infektionen nicht ausschließen.

Zudem ist es erwünscht, fetale Zellen möglichst schonend zu gewinnen ohne Veränderung ihrer Oberfläche, z.B. ohne Veränderung der Primärstrukturen, Sekundärstrukturen und weiterer Strukturen der an der Oberfläche, in der Zellwand bzw. Zellmembran angeordneten Verbindungen, deren Unveränderbarkeit als Maß 5 für die schonende Aufarbeitung der Zellen dienen kann.

Die isolierten fetalen Zellen und deren Genom können zur Analyse von Erbschäden, wie Punktmutationen, Chromosomanomalien, Chromosomenaberrationen verwendet werden, ohne dass im Gegensatz zum Stand der Technik die Notwendigkeit besteht, zuvor Zellen aus den Fruchtwasser oder dem Gebärmutterapparat 10 zu entnehmen, so dass die Risiken des Abortus ausgeschlossen werden können.

Die Ceramid-Verbindungen sind Oberflächenmoleküle von Vorläuferzellen roter Blutzellen. Es wird angenommen, dass es während der postnatalen Entwicklung 15 zur Verzweigung der Polylactosaminoglycane kommt. Dieser Reifungsvorgang der Kohlenhydratketten, der sich auch in Vorstufen der Erythrocyten im Knochenmark von Erwachsenen vollzieht, führt zur Verminderung der Lacto-N-nor-hexaosyl-Ceramid-Verbindung als i-Antigen (oder auch Antigen-i genannt) und zur Verstärkung der Lacto-N-iso-octaosyl-Ceramid-Verbindung als Antigen-I 20 oder auch I-Antigen genannt. Das Antigen-I ist folglich bei Geburten nur schwach, wenn überhaupt, ausgebildet. Erst mit etwa 18 Monaten erreicht es die Menge und Konzentration, die es beim Erwachsenen aufweist. Das i-Antigen ist beim Neugeborenen voll ausgebildet. Es geht folglich in den ersten 18 Monaten nach der Geburt verloren und wird durch Antigen-I ersetzt.

Es besteht nunmehr das Bedürfnis, Verfahren bereitzustellen, welche eine hohe Anreicherung von fetalen Zellen unter Beseitigung mütterlicher Blutzellen und eine schonende Anreicherung derselben ermöglicht. Die DNA der hoch angereicherten fetalen Zellen kann Aufschluß geben über die Primärstruktur bis Quartärstrukturen der Gensequenzen, ohne dass die Analyseergebnisse durch Genom der mütterlichen Blutzellen beeinflusst oder gar verändert werden. Darüber hinaus besteht auch der Wunsch, rasch und jederzeit Erzeugnisse bzw. Zellen aus Föten ohne unmittelbaren Eingriff in dieselben bereitzustellen, welche zur Behandlung von Krankheiten, wie Erbkrankheiten, und deren Früherkennung und Therapie dienen können.

So wird in der US-PS 54 37 987 ein Verfahren beschrieben, bei welchem fetale rote Blutzellen aus mütterlichem Blut angereichert werden und Komplexe aus polyklonalen Antikörper und fetalen Zellen nach Zusatz des Antikörpers Anti-i abgetrennt werden; hierbei binden die polyklonalen Antikörper an die Oberflächenantigene i der fetalen Zellen.

Als Antikörper werden solche verwendet, deren Antigen-Bindungsregion mit der Gal β -4-GlcNAc β -1-3-Gal β -1-4-GlcNAc β -1-3-Gal β -1-4-Glc-Kette des Antigens als Antigen-Determinate spezifisch bindet. Dieser gegen die lineare Kohlenhydratkette gerichtete Antikörper benötigt mindestens zwei repetitierende N-Acetyl-Lactosamin-Einheiten zur Bindung. Die einfachste i-aktive Struktur ist demnach Lacto-N-nor-hexaosyl-Ceramid. Der Antikörper, welcher sich an Lacto-N-nor-hexaosyl-Ceramid oder Derivate desselben als Antigen zu binden vermag, wird im Sinne der Erfindung Anti-i genannt.

In dem herkömmlichen Verfahren werden zwecks Abtrennung des Antikörper-Antigen-Komplexes magnet-aktivierte Zellsortierungsverfahren angewendet, die aber nur in wenig hinreichendem Ausmaß die fetalen Zellen anzureichern vermögen, da die fetalen Zellen in einem verschwindend geringen Verhältnis und

5 Ausmaß in dem Antikörper-Antigen-Komplex vorhanden sind.

- Die gesuchten Zellen sind extrem selten in einem Überschuß maternaler Zellen, so dass die fetalen Zellen nur in einem geringen Grad angereichert werden, aber nicht bis zur Reinheit. Durch das Fehlen fetusspezifischer Eigenschaften der
- 10 bisher erhältlichen Antikörper sind nennenswerte, sogenannte zelluläre Verunreinigungen mit mütterlichen im wesentlichen Blutzellen nicht zu verhindern. Außerdem ist mit magnet-aktivierten Zellsortierungsverfahren die Vereinzelung von Zellen nicht möglich.
- 15 Aufgabe ist es auch folglich, ein schonendes Reinigungsverfahren bzw. ein Anreicherungsverfahren darzustellen, welches einen hohen Anreicherungsgrad an fetalen Zellen ermöglicht. Diese fetalen Zellen können als Erzeugnisse in einem Diagnostizierverfahren eingesetzt werden.
- 20 Die Aufgabe der Erfindung wird gelöst durch den Hauptanspruch und den Nebenanspruch. Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterentwicklungen der Erfindung.
- 25 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur hohen Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus, vorzugsweise peripherem, mütterlichem Blut, wobei im

Schritt a) nach einer Entnahme von mütterlichem Blut in Gegenwart von einer Antikoagulation enthaltenden Lösung zur Bereitstellung einer Blutfraktion das Blut mit einer isotonischen Lösung verdünnt sowie

5 Schritt b) die Blutfraktion zwecks Anreicherung einer Zellfraktion mit zellkernhaltigen fetalen Zellen zentrifugiert werden, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass im

Schritt c) zu der Zellfraktion

10 ein Antikörper-Cocktail aus Antikörpern des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs, vorzugsweise bei RT für 15 bis 30 min, noch mehr bevorzugt 10 bis 20 min, lang, welcher

15 Antikörper Anti-w, die an Antigene der intracellulären Strukturen von weißen Blutkörperchen und / oder der intracellulären Moleküle von weißen Blutkörperchen und / oder Oberflächen von weißen Blutkörperchen spezifisch binden,

und

20 Antikörper Anti-r, die an Antigene der intracellulären Strukturen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen und / oder der intracellulären Moleküle von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen und / oder der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden, enthält,

25

zugegeben wird

sowie man

- Antikörper Anti-i des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs, die an
5 Antigen-i als Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter
Blutkörperchen spezifisch binden,

und / oder

- 10 Antikörper Anti i plus des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs, die
an intracellulären Strukturen von fetalen Vorläuferzellen und / oder der intracellu-
lären Moleküle von fetalen Vorläuferzellen und / oder Membranbruchstücken von
fetalen Vorläuferzellen spezifisch binden, zugibt,

- 15 unter Bildung eines Zell-Ansatzes, welcher Antikörper-Komplexe enthält,
die an fetale Zellen gekoppelte Antikörper Anti-r und Anti-i, und gegebenenfalls
Anti-i plus, umfassen,

und

20

- Schritt d) aus dem Zell-Ansatz fetale Zellen mit an denselben gekoppel-
ten Antikörpern Anti-r und / oder Antikörpern Anti-i, vorzugsweise und / oder
Antikörper Anti-i plus, aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften,
den Eigenschaften von Oberflächen und von Zellinnerem sowie der Größenvertei-
25 lung der fetalnen Zellen mit 10^5 bis 10^7 -facher Anreicherung der fetalnen Zellen,
vorzugsweise bis zur deren zellulären Reindarstellung, abgetrennt wird.

Ein Gegenstand der Erfindung bezieht sich auch auf eine Verwendung der Zellfraktion als Erzeugnis, welches nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herstellbar ist, zur Behandlung von Erbkrankheiten, vorzugsweise im fetalen Alter,
5 zum Einsatz in Diagnoseverfahren, durch beispielsweise Genomuntersuchung.

†

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung umfasst fetale Zellen aus venösem Blut, welche herstellbar sind durch im

10 Schritt a) Verdünnung von nach einer Entnahme von mütterlichem bereitgestelltem Blut in Gegenwart von einer Antikoagulation enthaltenden isotonischen Lösung zur Bereitstellung einer Blutfaktion sowie

15 Schritt b) Zentrifugation der Blutfaktion zwecks Anreicherung einer Zellfraktion mit zellkernhaltigen fetalen Zellen,

Schritt c) Inkubation der Zellfraktion mit einem Antikörper-Cocktail aus Antikörpern des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs bei RT für 15 bis 30 min, vorzugsweise 10 bis 20 min, lang, welcher

20 Antikörper Anti-w, die an Antigene der intracellulären Strukturen von weißen Blutkörperchen und / oder der intracellulären Moleküle von weißen Blutkörperchen und / oder Oberflächen von weißen Blutkörperchen spezifisch binden,

und

Antikörper Anti-r, die an Antigene der intracellulären Strukturen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen und / oder der intracellulären Moleküle von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen und / oder der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden,
5 enthält,

und mit

10 Antikörpern Anti-i des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs, die an Antigen-i als Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden,

und / oder

15 Antikörpern Anti i plus des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs, die an intracellulären Strukturen von fetalen Vorläuferzellen und / oder der intracellulären Moleküle von fetalen Vorläuferzellen und / oder Membranbruchstücke von fetalen Vorläuferzellen spezifisch binden,

20 unter Bildung eines Zell-Ansatzes aus Antikörper-Komplexen, welche an fetale Zellen gekoppelte Antikörper Anti -r und Anti-i und / oder Anti-plus umfassen,

25 Schritt d) Abtrennung fetaler Zellen mit den an denselben gekoppelten Antikörpern Anti-r und Antikörpern Anti-i, vorzugsweise und / oder Antikörper Anti i plus, aus dem Zell-Ansatz aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigen-

schaften, den Eigenschaften von Oberflächen und von Zellinnerem sowie der Größenverteilung mit 10^5 bis 10^7 -facher Anreicherung der fetalen Zellen, vorzugsweise bis zur deren zellulären Reindarstellung.

5 Im Sinne der Erfindung werden unter den intracellulären Strukturen von weißen Blutkörperchen oder von fetalen Vorläuferzellen z.B. Zellorganellen, wie Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum, und Zellkerne verstanden.

10 Im Sinne der Erfindung werden unter den intracellulären Molekülen von weißen Blutkörperchen oder von fetalen Vorläuferzellen z.B. zellspezifische Produkte oder Verbindungen, beispielsweise Proteine, wie Enzyme, Proteinderivate, wie fetales Hämoglobin, verstanden.

15 Im Sinne der Erfindung werden unter Antigenen der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen z.B. Transferrin-Rezeptor-Moleküle verstanden.

20 Im Sinne der Erfindung wird unter Zugeben bzw. Zugabe das Zusetzen gleichzeitig oder nacheinander von Antikörper-Cocktail und Antikörpern Anti i und Antikörpern Anti i plus verstanden.

So kann beispielsweise nacheinander zuerst der Antikörper-Cocktail der Zellfraktion zugesetzt, anschließend die Antikörper Anti i zugesetzt und dann die Antikörper Anti i plus zugesetzt werden.

Ebenso ist es möglich, nacheinander zuerst den Antikörper-Cocktail der Zellfraktion zuzusetzen und anschließend die Antikörper Anti i plus und dann die Antikörper Anti i.

Auch kann man gleichzeitig den Antikörper-Cocktail, die Antikörper Anti i und die Antikörper Anti i plus der Zellfraktion zusetzen.

Im Sinne der Erfindung wird unter Zugeben bzw. Zugabe das Zusetzen
5 gleichzeitig oder nacheinander von Antikörper-Cocktail auch verstanden, dass beispielsweise

im Schritt c) zuerst der Antikörper-Cocktail als Mischung aus Antikörper Anti-w und Antikörper Anti-r der Zellfraktion zugegeben wird,

oder

10 im Schritt c) zuerst der Antikörper Anti-w der Zellfraktion und dann Antikörper Anti-r zugegeben wird,

oder

15 im Schritt c) zuerst der Antikörper Anti-r der Zellfraktion und dann Antikörper Anti-w zugegeben wird.

Im Sinne der Erfindung wird unter Inkubation das Zusetzen gleichzeitig oder nacheinander von Antikörper-Cocktail und Antikörpern Anti i und Antikörpern Anti i plus, wobei

20 im Schritt c) zuerst der Antikörper-Cocktail als Mischung aus Antikörper Anti-w und Antikörper Anti-r der Zellfraktion zugegeben werden oder

im Schritt c) zuerst der Antikörper Anti-w der Zellfraktion und dann Antikörper Anti-r zugegeben werden oder

25 im Schritt c) zuerst der Antikörper Anti-r der Zellfraktion und dann Antikörper Anti-w zugegeben werden können.

Im Schritt c) können die Zugaben des Antikörper-Cocktails, der Antikörper Anti-i oder der Antikörper Anti-i-plus oder Mischungen der Antikörper Anti-i oder der Antikörper Anti-i-plus gleichzeitig oder nacheinander erfolgen. Ebenso können Mischungen Antikörper Anti-i des polyklonalen und / oder monoklonalen 5 Typs und / oder Antikörper Anti i plus des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs enthalten.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird aus mütterlichem, vorzugsweise peripherem, wie venösem und / oder arteriellem, Blut, beispielsweise aus der 10 Armvene, eine Blutfraktion entnommen und in ein Gefäß überführt, welches einen oder mehrere herkömmliche Komplexbildner als Antikoagulantien aufweist. Als Komplexbildner können Ethylendiamintetraessigsäure-Verbindungen, Heparin-, Citronensäure-Verbindungen und / oder Salze derselben und / oder Derivate derselben Verwendung finden. Ethylendiamintetraacetat-Verbindungen bzw. deren 15 Derivate in für den Fachmann bekannten Konzentrationen dienen als geeignete Gerinnungshemmer ohne Zwischenwirkungen bei den sich anschließenden Aufarbeitungsschritten.

Unter fetalen Zellen, welche nach dem erfindungsgemäßen Verfahren angereichert werden können und anreicherbar sein können, werden im Sinne der Erfindung fetales zellkernhaltige Vorläuferzellen der Erythrocyten verstanden. Die anzureichernden fetalen Zellen haben einen Zellkern und einen Transferrin-Rezeptor. 20

Unter Transferrin-Rezeptoren werden im Sinne der Erfindung solche Verbindungen verstanden, die der Funktion des Eisen-Überträgers in die Zelle dienen 25

und auf den Zelloberflächen der ausgereiftem Erythrocyten nicht mehr zu finden sind. Transferrin ist ein Eisen-Überträger in die Zelle.

- Die ausgereiften Zellen aus den Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen,
5 nämlich die kernlosen Erythrocyten, weisen im wesentlichen keine Transferrin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche auf.

Die Blutfaktion wird einem Dichtegradientenzentrifugationsschritt unterworfen. In dem Dichtegradientenverfahren können im wesentlichen die kernhaltigen fetalnen Vorläuferzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte von den anderen Zellen aus der Fraktion angereichert werden, jedoch finden sich gleichfalls auch in der Zellfraktion wegen der in allen Fraktionen auftretenden sogenannten Schlierung Erythocyten.
10

15 Die kernhaltigen Zellen konzentrieren sich unter dem Einfluß der Schwerkraft entsprechend ihrer Dichte in einer Grenzschicht, auch buffy-coat-Schicht genannt, zwischen der oberen Fraktion, dem verdünnten Blutplasma der Blutfaktion, und der unteren Fraktion mit einem Anteil aus Saccharose als Kissen an.

20 Der Saccharose-Polymeren-Anteil kann beispielsweise ein synthetisches Polymer aus Saccharose mit einem Molekulargewicht von 70.000 bis 400.000 Dalton, vorzugsweise 400.000 Dalton, z.B. Ficoll, vorzugsweise kolloidales, Polyvinylpyrrolidon beschichtete Silika Partikel, wie Percoll, oder dergleichen sein. Der Saccharose-Polymeren-Anteil befindet sich in einer isotonischen Lösung aus gepufferter physiologischer Kochsalzlösung mit pH-Werten zwischen 7,2 bis 7,4, vorzugsweise 7,2.
25

Als Puffer können herkömmliche Natriumchlorid enthaltende verwendet werden, wie Kaliumphosphat- und / oder Natriumphosphatpuffer, NaH_2PO_4 , Na_3HPO_4 mit oder ohne NaN_3 .

5

So kann das Kissen aus isotonischer Saccharose-Polymeren-Lösung mit der Blutfraktion, gegebenenfalls nach deren vorhergehender Verdünnung mit einem Volumenverhältnis von 1 : 1 (Vol:Vol) mit phosphatgepufferter Kochsalz-Pufferlösung überschichtet werden; zu 1 Volumenteil Saccharose-Polymeren-Lösung werden 1 Volumenteil Blutfraktion gegeben.

Nach einer Zentrifugation von bis zu 60 min, vorzugsweise ca. 15 bis 60 sec, noch mehr bevorzugt 45 sec, lang bei 800 x g sedimentieren die roten, aber physikalisch dichteren Erythrocyten in das Saccharosekissen. Die weniger dichten 15 kernhaltigen fetalen Zellen sammeln sich als sogenannte buffy-coat-Schicht an der Grenzschicht zwischen der verdünnten oberhalb des Kissens sich befindlichen Blutfraktion und dem dichteren unteren Kissen an. Die buffy-coat-Schicht, regelmäßig sichtbar als weißer Ring, wird in ein Gefäß überführt, und die Zellfraktion der buffy-coat-Schicht mit phosphatgepufferter Kochsalz-Pufferlösung gewaschen.

Dann wird die gewaschene Zellfraktion einer Antikörper-Inkubation zugeführt. Die Zellfraktion kann enthalten:
fetale zellkernhaltige Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen, welche i-
25 Antigen und Antigen-r und / oder Antigen-i-plus aufweisen,

- z.T. fetale rote zellkernlose Blutkörperchen, also ausgereifte, welche I-Antigen und keine Transferrin-Rezeptoren enthalten,
- z.T. maternale zellkernhaltige Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen,
5 welche I-Antigen und die Transferrin-Rezeptoren aufweisen, und noch
- z.T. maternale rote zellkernlose Blutkörperchen, also ausgereifte, welche I-Antigen und keine Transferrin-Rezeptoren aufweisen.
- 10 Die aufgrund des Dichtegradientenverfahrens angereicherten kernhaltigen Zellen der Zellfraktion weisen in der Regel eine hohe Anzahl an mütterlichen Zellen (1 bis 4×10^7 Zellen) im Vergleich zu 20 bis 50 fetalnen Zellen in der Zellfraktion auf.
- 15 In dem folgenden Anreicherungsschritt wird z.B. ein Antikörper-Cocktail verschiedener Antikörper des monoklonalen Typs und / oder polyklonalen Typs zugegeben, um einen Zell-Ansatz aus Antikörper-Komplexen bereitzustellen. So kann auch im Schritt c) zuerst der Antikörper-Cocktail als Mischung aus Antikörper Anti-w und Antikörper Anti-r der Zellfraktion oder
- 20 im Schritt c) zuerst der Antikörper Anti-w der Zellfraktion und dann Antikörper Anti-r oder
- im Schritt c) zuerst der Antikörper Anti-r der Zellfraktion und dann Antikörper Anti-w zugegeben werden.

So kann ein Verfahren zur hohen Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus, vorzugsweise peripherem, mütterlichem Blut, bereitgestellt werden, wobei im

5 Schritt a) nach einer Entnahme von mütterlichem Blut in Gegenwart von einer Antikoagulation enthaltenden Lösung zur Bereitstellung einer Blutfraktion das Blut mit einer isotonischen Lösung verdünnt sowie

10 Schritt b) die Blutfraktion zwecks Anreicherung einer Zellfraktion mit zellkernhaltigen fetalen Zellen, vorzugsweise mittels Dichtegradienten, zentrifugiert werden, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass im

15 Schritt c) zu der Zellfraktion ein Antikörper-Cocktail aus Antikörpern des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs, vorzugsweise im Überschuß, bei RT für 5 bis 30 min, vorzugsweise 10 bis 20 min, oder 5 oder 10 min, lang, welcher Antikörper Anti-w, die an Antigene der Oberflächen von weißen Blutkörperchen spezifisch binden können,

20 Antikörper Anti-r, die an Transferrin-Rezeptor-Moleküle als Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden können, und / oder

Antikörper Anti-i, die an Antigen-i als Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden, und vorzugsweise Antikörper Anti i plus, die an Membranbruchstücke von fetalen Vorläuferzellen spezifisch binden können, enthält,

unter Bildung eines Zell-Ansatzes, welcher Antikörper-Komplexe enthält, die an fetale Zellen gekoppelte Antikörper Anti-r und Anti-i, und gegebenenfalls Anti-i plus, umfassen können,

zugegeben wird, und

5

Schritt d) aus dem Zell-Ansatz fetale Zellen mit an denselben gekoppelten Antikörpern Anti-r und / oder Antikörpern Anti-i, vorzugsweise und / oder Antikörper Anti-i plus, aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften, nach den Eigenschaften von Oberflächen und / oder von Zellinnerem und / oder der Größenverteilung der fetalnen Zellen mit 10^5 bis 10^7 -facher Anreicherung der fetalnen Zellen, vorzugsweise bis zur deren zellulären Reindarstellung, abgetrennt wird.

Ebenso kann eine Verwendung der Zellfraktion als Erzeugnis bereitgestellt werden, welches nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herstellbar ist, zur Behandlung von Erbkrankheiten, vorzugsweise im fetalnen Alter, zum Einsatz in Diagnoseverfahren, durch beispielsweise Genomuntersuchung.

Ebenfalls können bereitgestellt werden fetale Zellen aus venösem Blut, herstellbar durch im

20

Schritt a) Verdünnung von nach einer Entnahme von mütterlichem bereitgestelltem Blut in Gegenwart von einer Antikoagulation enthaltenden isotonischen Lösung zur Bereitstellung einer Blutfraktion sowie

Schritt b) Zentrifugation der Blutfraktion, vorzugsweise Dichtegradientenzentrifugation, zwecks Anreicherung einer Zellfraktion mit zellkernhaltigen fetalen Zellen,

- Schritt c) Inkubation der Zellfraktion mit einem Antikörper-Cocktail aus
- 5 Antikörpern des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs bei RT für 5 bis 30 min, vorzugsweise 10 bis 20 min, oder 5 oder 10 min, lang, welcher
Antikörper Anti-w, die an Antigene der Oberflächen von weißen Blutkörperchen spezifisch binden können ,
Antikörper Anti-r, die an Transferrin-Rezeptor-Moleküle als Antigene der
- 10 Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden können, und
Antikörper Anti-i, die an Antigen-i als Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden können, und / oder
Antikörper Anti i plus, die an Membranbruchstücke von fetalen Vorläuferzellen spezifisch binden können, enthält,
- 15 unter Bildung eines Zell-Ansatzes aus Antikörper-Komplexen, welche an fetaile Zellen gekoppelte Antikörper Anti -r und Anti-i und / oder Anti-i-plus umfassen können, enthält,
- 20 Schritt d) Abtrennung fetaler Zellen mit den an denselben gekoppelten Antikörpern Anti-r und Antikörpern Anti-i, vorzugsweise und / oder Antikörper Anti i plus, aus dem Zell-Ansatz aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften nach der Dichte, den Eigenschaften von Oberflächen und von Zellinnerem sowie der Größenverteilung mit 10^5 bis 10^7 -facher Anreicherung der fetalen Zellen,
25 vorzugsweise bis zur deren zellulären Reindarstellung.

Der Antikörper-Cocktail kann in einer Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens Antikörper des monoklonalen Typs und / oder polyklonalen Typs umfassen:

5 Antikörper Anti-w gegen Oberflächenantigene, die für weiße Blutkörperchen, wie Leukocyten, Lymphocyten, spezifisch sind, und

10 Antikörper Anti-r gegen Oberflächenantigene, hier gegen die Transferrin-Rezeptoren für rote noch kernhaltige Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen spezifisch sind

Antikörper Anti-i gegen Oberflächenantigene, gegen das Antigen-i

und / oder

15 Antikörper Anti-i plus gegen Membranbruchstücke von fetalen Vorläuferzellen, die für fetale zellkernhaltige Zellen spezifisch sind.

Aufgrund der Zugabe des Antikörper-Cocktails werden hierdurch kernhaltige
20 Leukocyten mit den Antikörpern Anti-w markiert, durch die Bindung der Antikörper Anti-w an weiße Blutkörperchen, wie Leukocyten, Lymphocyten, welche verworfen werden.

In einem anderen Anreicherungsschritt des erfindungsgemäßen Verfahrens
25 wird z.B. ein Antikörper-Cocktail verschiedener Antikörper des monoklonalen

Typs und / oder polyklonalen Typs zugegeben, um einen Zell-Ansatz aus Antikörper-Komplexen bereitzustellen.

Der Antikörper-Cocktail des erfindungsgemäßen Verfahrens kann Antikörper des monoklonalen Typs und / oder polyklonalen Typs umfassen:

Antikörper Anti-w, die an Antigene der intracellulären Strukturen von weißen Blutkörperchen und / oder der intracellulären Moleküle von weißen Blutkörperchen und / oder Oberflächen von weißen Blutkörperchen, wie Leukocyten,
10 Lymphocyten, spezifisch binden,

und

Antikörper Anti-r, die an Antigene der intracellulären Strukturen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen und / oder der intracellulären Moleküle von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen und / oder der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden, z.B. die gegen Oberflächenantigene, wie gegen die Transferrin-Rezeptoren, für rote noch kernhaltige Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen spezifisch sind.

20

Die polyklonalen und / oder monoklonalen Antikörper Anti-i gegen das Antigen-i

und

25

polyklonalen und / oder monoklonalen Antikörper Anti-i-plus, die an intracellularen Strukturen von fetalen Vorläuferzellen und / oder der intracellulären Moleküle von fetalen Vorläuferzellen und / oder Membranbruchstücke von fetalen Vorläuferzellen spezifisch binden, die für fetale zellkernhaltige Zellen spezifisch sind,

können zu dem Antikörper-Cocktail zugegeben werden, bevor dieser mit zu der Zellfraktion zugesetzt wird, wenn beispielsweise deren gleichzeitige Inkubation mit der Zellfraktion erfolgen soll.

10

Ebenso können nur die Antikörper Anti-i zu dem Antikörper-Cocktail zugegeben werden, wenn beispielsweise die Inkubation mit der Zellfraktion gleichzeitig erfolgen soll. Ebenfalls können nur die Antikörper Anti-i plus zu dem Antikörper-Cocktail zugegeben werden, wenn beispielsweise die Inkubation mit der Zellfraktion gleichzeitig erfolgen soll.

Bei einer Inkubation, welche nacheinander erfolgen kann, können

zu der Zellfraktion zuerst der Antikörper-Cocktail, anschließend nach der Inkubation der Zellfraktion mit dem Antikörper-Cocktail die Antikörper Anti-i plus oder die Antikörper Anti-i zu Zellfraktion-Antikörper-Cocktail zugegeben werden

oder

25

zu der Zellfraktion zuerst der Antikörper-Cocktail, anschließend nach der Inkubation der Zellfraktion mit dem Antikörper-Cocktail die Antikörper Anti-i zusammen mit Antikörper Anti-i plus zu Zellfraktion-Antikörper-Cocktail zugegeben werden.

5

Weiterhin werden fetale, kernlose rote Blutkörperchen durch die Bindung der Antikörper Anti-i an das Antigen-i markiert, welche verworfen werden können.

10

Weiterhin werden die anzureichernden fetalen noch kernhaltigen Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen

15

durch die Bindung der Antikörper Anti-i wegen deren Bindung z.B. an Antigene der intracellulären Strukturen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen und / oder Antigene der intracellulären Moleküle von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen und / oder Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden, wie an die Transferrin-Rezeptoren bzw. deren Bindung an Antigene der Oberflächen, die spezifisch für kernhaltige Vorläuferzellen roter Blutkörperchen sind,

20

und

durch die Bindung der Antikörper Anti-i an das Antigen-i
und / oder

gegebenenfalls, um vorzugsweise die spezifische Anreicherung der fetalen Zellen noch zusehends erhöhen zu können,

25

durch die Bindung der Antikörper Anti i plus an intracelluläre Strukturen, welche für fetale Vorläuferzellen und / oder der intracelluläre Moleküle von fetalen Vorläuferzellen und / oder Membranbruchstücke von fetalen Vorläuferzellen spezifisch binden, markiert.

5

So kann die anzureichernde fetale noch kernhaltige Vorläuferzelle eines roten Blutkörperchens beispielsweise an und / oder auf ihrer Oberfläche sowohl Antikörper Anti-i und Antikörper Anti-r aufweisen. Ebenso kann die anzureichernde fetale noch kernhaltige Vorläuferzelle eines roten Blutkörperchens beispielsweise an und / oder auf ihrer Oberfläche sowohl Antikörper Anti-i, Antikörper Anti-r und Antikörper Anti-i plus aufweisen, um beispielsweise in dem nachfolgenden Schritt d) die spezifische zelluläre Abtrennung zu erhöhen.

Die maternalen ausgereiften Erythrocyten können wegen Mangels an Transferrin-Rezeptoren und Antigen-i und / oder Antigen-i-plus nicht durch die Antikörper Anti-w, Anti-r, Anti-i und / oder Anti i plus markiert werden bzw. an diese können die Antikörper Anti-w, Anti-r, Anti-i und / oder Anti i plus nicht spezifisch binden, welche verworfen werden sollen.

In einer besonderen Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens bzw. der Darstellung erfindungsgemäßer fetaler Zellen kann ein weiterer Zwischen- schritt vor dem Verfahrensschritt d) durchgeführt werden: dieses Verfahren der magnetischen An- bzw. Abreicherung von Zellen verwendet kommerziell erhältliche Antikörper, die z.B. teilweise unter die beschriebenen Antikörper Anti-r und Anti-w fallen; jedoch können in diesem Verfahren nicht die Antikörper der Spezies Anti-i bzw. Anti-i-plus enthalten sein. Durch die zusätzliche Verwendung

eines magnetaktivierten Zellsortierungsverfahren mit Antikörpern der oben genannten Art, z.B. Anti-w sowie Anti-r, nach einer Zentrifugation kann das erfindungsgemäße Verfahren zeitlich bei der Sortierung beschleunigt werden. Auch die Verwendung der magnetaktivierten Zellsortierung ermöglicht in Kombination mit 5 den o.g. Verfahrensschritten des erfindungsgemäßen Verfahrens bzw. mit den der Darstellung erfindungsgemäßer fetaler Zellen die Beschleunigung der Reinigung fetaler Zellen.

In einem weiteren Verfahrensschritt wird der Zell-Ansatz Durchfluß-
10 Cytometer-Verfahren unterworfen. Bei diesen Verfahren können verschiedene mittels Antikörper markierten Zellen auf Grundlage der den markierten Antikörpern und den Zellen zu eigenen unterschiedlichen Lichtstreuungs- und / oder verschiedenen emitierten Fluoreszenzeigenschaften unterschieden und voneinander getrennt werden.

15

Die entsprechend mit Antikörper markierten Zellen werden im Mantelstromverfahren als Einzelzellsuspension in einer Meßkammer mit Laserlicht angeregt und das Licht anschließend mittels Durchlicht-, Streulicht- und Fluoreszenzdetektoren charakterisiert. Weiterhin passiert der Flüssigkeitstrom Ablenkplatten, und 20 die unter Mithilfe der oben angegebenen Eigenschaften als fetal charakterisierten Zellen erhalten einen elektrischen Impuls, der sie seitlich aus dem Flüssigkeitstrahl ablenkt. Hiermit lassen sich die fetalen Zellen bis zur Reinheit unter anderem als Einzelzellen in entsprechenden Behältnisse wie z.B. Microtiterplatten sortieren.

25

Aufgrund des Durchfluß-Cytometerverfahrens werden fetale Erythrocyten-Vorläuferzellen als fetale Zellen mit dem Oberflächenantigen i und / oder Oberflächenantigen i plus in hinreichender Weise schonend angereichert.

5 Die Antikörper des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs können durch aus Zellen, Geweben oder Organen isolierte oder rein dargestellte, wie native, Antigene, und / oder durch chemisch synthetisierte Antigene induziert werden.

Die für den Antikörper-Cocktailschritt bereitzustellenden Antikörper sind
10 z.B. solche, die

als Anti-i spezifisch mit Lacto-N-nor-hexaosyl-Ceramid-Verbindungen des nativen Typs (aus Zellen isolierbaren) und /oder des synthetischen Typs (chemisch herstellbar) oder mit Derivaten derselben des nativen Typs (aus Zellen isolierbaren) und /oder des synthetischen Typs (chemisch herstellbar) und / oder
15

als Anti i plus spezifisch mit intracellulären Strukturen von fetalen Vorläuferzellen und / oder der intracellulären Moleküle von fetalen Vorläuferzellen und / oder Membranbruchstücken von fetalen Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen
20 zu reagieren vermögen.

Die Antikörper mit Spezifität für Anti-i können der IgM-Klasse angehören.

Unter einem Antikörper wird im Sinne der Erfindung auch verstanden, solcher, welcher mit dem Antigen i spezifisch reagieren kann. Spezifische Antikörper
25

können Immunglobuline darstellen, die als Ergebnis antigener Stimulation produziert werden.

Die polyklonalen Antikörper können herstellbar sein aus Wirbeltieren jeglicher Spezies, wie Pferden, Schafen, Mäusen und / oder Kaninchen oder dergleichen. Die monoklonalen Antikörper können herstellbar sein aus z.B. B-Lymphocyten von Wirbeltieren jeglicher Spezies, wie Pferden, Schafen, Mäusen und / oder Kaninchen oder dergleichen.

Im Sinne der Erfindung werden auch unter monoklonalen Antikörper solche Immunglobuline verstanden, welche spezifisch nur gegen eine einzige antigene Determinante, wie der Lacto-N-nor-hexaosyl-Ceramid-Verbindungen und /oder Derivate derselben, welche chemisch synthetiert oder aus Zellen nativ rein darstellbar sein könne, gerichtet sind.

Die monoklonalen Antikörper Anti-w, Anti-r, und Anti-i, Anti-i plus sind mit herkömmlichen Hybridomtechniken synthetisierbar. Hierbei wird ein einziger Antikörper-produzierender B-Lymphocyt in Kultur kloniert, so dass monoklonale Antikörper Anti i, Anti-r oder Anti-w oder Anti-i plus in großen Mengen erhalten werden können. Z.B. werden die B-Lymphocyten einer gegen die Lacto-N-nor-hexaoosyl-Ceramid-Verbindung als Antigen immunisierten Maus mit Zellen eines unbegrenzt teilungsfähigen B-Lymphocytentumors fusioniert. Aus den entstandenen Fusionsprodukten werden durch Verwendung herkömmlicher Selektionsmedien diejenigen Hybridzellen selektioniert, die einerseits z.B. den Antikörper Anti-i produzieren und andererseits die Fähigkeit erworben haben, sich in Kultur unbegrenzt zu teilen. Jede einzelne dieser hybridomen Zellen ist Ausgangspunkt eines

individuellen Zellklons, der permanent wächst und dabei einen bestimmten monoklonalen Antikörper herstellt.

Die monoklonalen Antikörper Anti-w, Anti-r, Anti-i und / oder Anti-i plus 5 können gleichzeitig mit Fluorescein-Isothiocyanat-Verbindungen (FITC), PE oder dergleichen zur Bereitstellung von fluorochromen Antikörpern gekoppelt sein. Auch bei großer Verdünnung sind die Antikörper, welche an dem Antigen koppelbar sind, aufgrund der Fluoreszenzmarkierung feststellbar und erhöhen die Ausbeute der Zellsortiererverfahren.

10

Als Antikörper Anti-w, Antikörper Anti-r, Antikörper Anti-i, Antikörper Anti-i plus können auch polyklonale verwendet werden, welche in Wirbeltieren wie Säugern, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schafen, Pferden usw., nach dem Fachmann bekannten Methoden induziert und isoliert werden können. So kann z.B. der 15 Antikörper Anti-i durch Zugabe von Lacto-N-nor-hexaosyl-Ceramid-Verbindung des nativen und / oder synthetischen Typs und / oder deren Derivaten des nativen und / oder synthetischen Typs in Wirbeltieren, z.B. Säugern, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schafen, Pferden usw., nach den dem Fachmann bekannten Methoden induziert und isoliert werden.

20

Ebenso können polyklonale Antikörper Anti-i plus eine Mischung aus verschiedenen Spezies von Antikörpern sein, wobei diese durch Verabreichung von intracellulären Strukturen von fetalen Vorläuferzellen und / oder der intracellulären Moleküle, welche für fetale Vorläuferzellen spezifisch sind, und / oder Membranbruchstücken, welche für fetale Vorläuferzellen spezifisch sind, zum Beispiel Membranbruchstücken fetaler, vorzugsweise kernhaltiger, Zellen, wie fetaler Vor-

läuferzellen der roten Blutkörperchen, in Wirbeltieren, z.B. Säugern, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schafen, Pferden usw., induziert und angereichert oder rein auf herkömmliche Weise dargestellt sein können. Die Mischung kann z.B. eine Spezies als Antikörper sein, welche spezifisch gegen Antigen-i ist bzw. mit Antigen-i bindet und eine oder weitere Spezies enthalten, die spezifisch an ein Oberflächenmolekül bzw. an Oberflächenmolekülen der Membranbruchstücke fetaler Zellen, wie fetaler Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen, zu binden bzw. mit diesen zu reagieren vermögen.

10 Der Antikörper-Cocktail kann Fluorescein-, Phycoerythrin und / oder Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) markierte Antikörper (20 µl je Antikörper) des monoklonalen Typs, des polyklonalen Typs oder Mischungen derselben mit 0,1 bis 10,00 µg, vorzugsweise 0,2 bis 5,0, noch mehr bevorzugt 0,2 µg, Protein / µl Antikörper- Cocktail, vorzugsweise in PBS, enthalten.

15

Als Antikörper kann der Antikörper-Cocktail enthalten zur gleichzeitigen Inkubation mit der Zellfraktion:

20 µl Antikörper Anti-w mit 0,1 bis 10,00 µg, vorzugsweise 0,2 bis 5,0, noch mehr bevorzugt 0,2 µg, Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an Antigene der Oberfläche von weißen Blutkörperchen spezifisch binden,

25 20 µl Antikörper Anti-r mit 0,1 bis 10,00 µg, vorzugsweise 0,2 bis 5,0, noch mehr bevorzugt 0,2 µg, Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden, und

20 µl Antikörper Anti-i mit 0,1 bis 10,00 µg, vorzugsweise 0,2 bis 5,0, noch mehr bevorzugt 0,2 µg, Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an das fetale Antigen-i auf roten Vorläuferzellen spezifisch binden.

5

Das Mischungsverhältnis von Antikörper-Cocktail zu Zell-Ansatz kann betragen 0,1 bis 100,0 µl, vorzugsweise 10,0 bis 60,0 µl, vorzugsweise 20,0 bis 40,0 µl noch mehr bevorzugt 20,0 µl, Antikörper-Cocktail zu im wesentlichen 10^5 - 10^9 , vorzugsweise 10^7 zellkernhaltigen Zellen im Zell-Ansatz.

10

In einem weiteren bevorzugten Ansatz kann der Antikörper-Cocktail enthalten zur gleichzeitigen Inkubation mit der Zellfraktion:

20 µl Antikörper Anti-w mit 0,1 bis 10,00 µg, vorzugsweise 0,2 bis 5,0,
15 noch mehr bevorzugt 0,2 µg, Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an Antigene der Oberfläche von weißen Blutkörperchen spezifisch binden,

20 µl Antikörper Anti-r mit 0,1 bis 10,00 µg, vorzugsweise 0,2 bis 5,0, noch mehr bevorzugt 0,2 µg, Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die
20 an Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden, und

25 20 µl Antikörper Anti-i mit 0,1 bis 10,00 µg, vorzugsweise 0,2 bis 5,0, noch mehr bevorzugt 0,2 µg, Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an das fetale Antigen-i auf roten Vorläuferzellen spezifisch binden,

und / oder

5 Antikörper Anti-i plus mit 0,1 bis 10,00 µg, vorzugsweise 0,2 bis 5,0, noch mehr bevorzugt 0,2 µg, Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, gegen, vorzugsweise auch Antigen-i auf der Membranoberfläche enthaltende, Membranbruchstücke von fetalen roten Vorläuferzellen, die für fetale zellkernhaltige Zellen spezifisch sind.

- Gleichfalls können die Antikörper in den oben angegebenen Konzentrationen und Mengenverhältnissen auch nacheinander zu der Zellfraktion zugegeben werden; beispielsweise als Zugaben
- 10 im Schritt c) zuerst der Antikörper-Cocktail als Mischung aus Antikörper Anti-w und Antikörper Anti-r und
- dann Anti-i und / oder Anti-i-plus,
- 15 oder
- im Schritt c) zuerst der Antikörper-Cocktail als Mischung aus Antikörper Anti-w und Antikörper Anti-r und
- dann Anti-i-plus und / oder Anti-i,
- oder
- 20 im Schritt c) zuerst der Antikörper Anti-w und dann Antikörper Anti-r,
- dann Anti-i und / oder Anti-i-plus,
- oder
- im Schritt c) zuerst der Antikörper Anti-w und dann Antikörper Anti-r,
- dann Anti-i-plus und / oder Anti-i,
- oder
- 25 im Schritt c) zuerst der Antikörper Anti-r und dann Antikörper Anti-w,

dann Anti-i und / oder Anti-i-plus,
oder
im Schritt c) zuerst der Antikörper Anti-r und dann Antikörper Anti-w,
dann Anti-i-plus und / oder Anti-i.

5

Die Antikörper Anti-i plus können spezifisch reagieren mit Antigen-i; ebenso kann Antikörper Anti-i plus eine Mischung aus verschiedenen Spezies von Antikörpern sein, wobei z.B. der eine Antikörper spezifisch gegen Antigen-i und weitere Antikörper spezifisch an Oberflächenmolekülen der Membranbruchstücke fetaler Zellen, wie fetaler Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen, zu binden bzw. mit diesen zu binden vermögen. Auch in dieser besonderen Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann das Mischungsverhältnis von Antikörper-Cocktail zu Zell-Ansatz 0,1 bis 100,0 µl, vorzugsweise 10,0 bis 60,0 µl, vorzugsweise 20,0 bis 40,0 µl noch mehr bevorzugt 20,0 µl, Antikörper-Cocktail zu 10⁵-15 10⁹, vorzugsweise 10⁷ zellkernhaltigen Zellen, im Zell-Ansatz betragen.

Die Lacto-N-nor-hexaosyl-Ceramid-Verbindung ist eine natürlich vorkommende Substanz und ein Oberflächenantigen, die entweder aus Vorläuferzellen als Verbindung des nativen Typs isolierbar oder rein darstellbar bzw. als Verbindung des synthetischen Typs chemisch synthetisierbar sein kann und ein Indikator für fetale Zellen ist, welche bei gesunden erwachsenen Menschen im Blut nicht nachgewiesen werden kann. Lacto-N-nor-hexaosyl-Ceramid-Verbindung wird in der Regel mit der Bezeichnung i bezeichnet. Es handelt sich um eine Kette aus Zuckermolekülen, welche eine lineare, unverzweigte Kohlenhydratkette ist aus sich wiederholenden N-Acetyllactosamin-Einheiten. Das einfachste i-aktive Glucosphingolipid ist Lacto-N-nor-hexoosyl-Ceramid.

Ebenso ist es möglich, Antikörper in dem Antikörper-Cocktail einzusetzen, welcher als gegen Lacto-N-iso-octaosyl-Ceramid-Verbindungen und / oder gegen deren Derivate spezifisch reagiert.

5

Da bei gesunden erwachsenen Personen das Antigen i auf Zellen der Erythropoese, also Lacto-N-nor-hexaosyl-Ceramid-Verbindung, nicht nachzuweisen ist, ist dieses Antigen i ein geeigneter fetaler Marker für Zellen des peripheren Blutes. Alle Versuche zeigen, dass Erwachsene kein Antigen i auf Zellen der Erythropoese aufweisen, wohl aber Feten, Neugeborene und Kleinkinder, aber auch im Blut schwangerer Frauen ist Antigen i als Oberflächenverbindung zu finden.

Die in dem Antikörper-Cocktail enthaltenen Antikörper sind monoklonale Antikörper mit einheitlicher Monospezifität. Diese monoklonalen Antikörper werden nach herkömmlichen dem Fachmann bekannten Schritten synthetisiert. Da das Antigen i als Zuckermolekül begrenzte immunogene Wirkung haben kann, werden wie folgt Antikörper gegen das Antigen i in einem Versuchstier hergestellt:

1. Gegen die native Form der humanen Lacto-N-nor-hexaosyl-Ceramid-
20 Verbindung

Hierzu werden reine Zellen aus dem Blut eines Neugeborenen mittels eines herkömmlichen Hochleistungszellsortierer auf zeitraubende Weise (z.B. Becton Dickinson, Vantage SE) isoliert, die i als das Antigen Lacto-N-nor-hexaosyl-
25 Ceramid-Verbindung auf der Oberfläche der Zellen aufweisen. Diese Zellen werden sowohl für die Produktion von polyklonalen Antiseren, z. B. in Kaninchen,

als auch für die Produktion von monoklonalen Antikörpern, z. B. in der Maus, benutzt.

2. Ebenso ist es möglich, Antikörper gegen die chemisch synthetisierte Form
5 des Antigens i Lacto-N-nor-hexaosyl-Ceramid-Verbindung herzustellen nach dem
Fachmann bekannten Methoden, wobei Antigen i in Reinform hergestellt und wie
unter 1. beschrieben verwendet werden kann.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens im Gegensatz zu dem her-
10 kömmlichen Verfahren sind unter anderem,

die Möglichkeit der Anreicherung fetaler Zellen ohne Verunreinigungen mit
mütterlichen Zellen,

15 die Isolierung der fetalen Zellen aus dem, vorzugsweise peripheren, mütterli-
chen Blut durch einfache Venenpunktion ohne Gefahr der Infektion der Bauch-
höhle,

20 die Bereitstellung von nach dem erfindungsgemäßen Verfahren bereitgestell-
ten Zellen zur Verwendung in Prüfverfahren der Gensequenzen, zur Behandlung
von Krankheiten, zur pränatalen Prüfung, beispielsweise auf Erbschäden, wie
Punktmutationen, Chromosomanomalien, Aneuploidien, ohne dass die Notwen-
digkeit besteht, Zellen aus den Fruchtwasser oder dem Gebärmutterapparat zu ent-
nehmen,

die Bereitstellung von Zellen zur Verwendung in Früherkennungsuntersuchungen zur möglichst frühzeitigen Erkennung vorhandener Krankheiten oder Entwicklungsstörungen, unter Wegfall risikobehafteter Verfahren, z.B. Amniocentese, Chordocentese oder 5 Chorionzottenbiopsie, sowie die Verringerung der Risiken von Abortus.

Ausführungsbeispiele

10 Bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der erfundungsgemäßen Lehre werden im übrigen in Verbindung mit den Erläuterungen der bevorzugten Ausführungsbeispiele in schematischer, stark vergrößerter Weise erläutert:

15 Entnommenes venöses mütterliches Blut wird in einer Antikoagulation enthaltenden isotonische Phosphatpufferlösung pH 7,2, 0,9 % (w/v) NaCl, 150 mM NaH₂PO₄/Na₃HPO₄, vorzugsweise mit NaN₃ zur Konservierung, (PBS) bei 25⁰ Celsius verdünnt zur Bereitstellung einer Blutfaktion. Die Blutfaktion wird bei 800 x g für 45 sec lang zwecks Anreicherung der Zellfaktion mit kernhaltigen fetalen Zellen als buffy-coat-Schicht bei Raumtemperatur zentrifugiert werden.

20 Dann wird die weiße buffy-coat-Schicht als Zellfaktion (z.B. 1 – 4 x 10⁷ Zellen) mit einem Antikörper-Cocktail aus Antikörpern des monoklonalen Typs bei Raumtemperatur für 20 min lang inkubiert zur Darstellung des Zell-Ansatzes.

Der Antikörper-Cocktail enthält Fluorescein-, Phycoerythrin und / oder Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) markierte Antikörper (20 µl je Antikörper) des monoklonalen Typs mit 0,2 µg Protein / µl Antikörper- Cocktail in PBS.

5 Als Antikörper enthält der Antikörper-Cocktail in einem Ausführungsbeispiel zur gleichzeitigen Inkubation mit der Zellfraktion:

10 20 µl Antikörper Anti-w mit 0,2 µg Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an Antigene der Oberfläche von weißen Blutkörperchen spezifisch binden,

15 20 µl Antikörper Anti-r mit 0,2 µg Protein / µl Antikörperlösung in z.B. PBS, die an Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden, und

20 20 µl Antikörper Anti-i mit 0,2 µg Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an das fetale Antigen-i auf roten Vorläuferzellen spezifisch binden.

25 Das Mischungsverhältnis beträgt 20,0 µl, Antikörper-Cocktail zu 10^5 - 10^9 , vorzugsweise 10^7 zellkernhaltigen Zellen im Zell-Ansatz.

In einem weiteren Ansatz eines Ausführungsbeispiels enthält der Antikörper-Cocktail zur gleichzeitigen Inkubation mit der Zellfraktion:

20 µl Antikörper Anti-w mit 0,2 µg Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an Antigene der Oberfläche von weißen Blutkörperchen spezifisch binden,

5 20 µl Antikörper Anti-r mit 0,2 µg Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden, und

10 20 µl Antikörper Anti-i mit 0,2 µg Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an das fetale Antigen-i auf roten Vorläuferzellen spezifisch binden, und / oder

15 20 µl Antikörper Anti-i-plus mit 0,2 µg Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS gegen, vorzugsweise auch Antigen-i auf der Membranoberfläche enthaltende, Membranbruchstücke von fetalnen Vorläuferzellen, die für fetales zellkernhaltige Zellen spezifisch sind. Das Mischungsverhältnis beträgt 20,0 µl, Antikörper-Cocktail zu 10^7 zellkernhaltigen Zellen im Zell-Ansatz.

In einem weiteren Ansatz eines Ausführungsbeispiels enthält der Antikörper-Cocktail lediglich Antikörper Anti-w und Antikörper Anti-r, welcher zuerst mit der Zellfraktion inkubiert wird, wobei anschließend die Zugaben der Antikörpern Anti-i und / oder den Antikörpern Anti-i-plus nacheinander zu der Antikörper-Cocktail-Zellfraktion erfolgen:

25 Antikörper-Cocktail:

20 µl Antikörper Anti-w mit 0,2 µg Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an Antigene der Oberfläche von weißen Blutkörperchen spezifisch binden,

5 und

20 µl Antikörper Anti-r mit 0,2 µg Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden, wobei das Mischungsverhältnis 20,0 µl
10 Antikörper-Cocktail zu 10^5 - 10^9 , vorzugsweise 10^7 , zellkernhaltigen Zellen im Zell-Ansatz beträgt.

Zu der Antikörper-Cocktail-Zellfraktion werden anschließend zugegeben:
entweder
15 20 µl Antikörper Anti-i mit 0,2 µg Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an das fetale Antigen-i auf roten Vorläuferzellen spezifisch binden,

oder

20 20 µl Antikörper Anti-i-plus mit 0,2 µg Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS gegen, vorzugsweise auch Antigen-i auf der Membranoberfläche enthaltende, Membranbruchstücke von fetalen Vorläuferzellen, die für fetale zellkernhaltige Zellen spezifisch sind.

25

Zu der Antikörper-Cocktail-Zellfraktion werden anschließend zugegeben in einem weiteren Ausführungsbeispiel eine Mischung aus

20 µl Antikörper Anti-i mit 0,2 µg Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS, die an das fetale Antigen-i roter Vorläuferzellen spezifisch binden,
5 und 20 µl Antikörper Anti-i plus mit 0,2 µg Protein / µl Antikörperlösung, vorzugsweise in PBS gegen, vorzugsweise auch Antigen-i auf der Membranoberfläche enthaltende, Membranbruchstücke von fetalen Vorläuferzellen, die für fetale zellkernhaltige Zellen spezifisch sind.

10 Als Antikörper Anti-i wird ein Antikörper mit einer spezifischen Bindung an Lacto-N-nor-hexaosylceramid und ein Antikörper Anti-i, welcher aus B-Lymphocyten einer gegen Lacto-N-nor-hexaosylceramid des nativen Typs und gegen Membranbruchstücke fetaler Zellen immunisierten Wirbeltieren, wie Maus und / oder Kaninchen, bereitgestellt ist, und ein weiterer, welcher aus B-Lymphocyten einer gegen Lacto-N-nor-hexaosylceramid des chemisch synthetisierten Typs immunisierten Maus und / oder Kaninchen bereitgestellt ist.
15

So wird als Antikörper Anti-i-plus ein Antikörper mit einer spezifischen Bindung an Membranbruchstücke, intrazelluläre Strukturen und / oder intrazelluläre Moleküle fetaler roter Vorläuferzellen und ein Antikörper Anti-i-plus bereitgestellt, welcher aus B-Lymphocyten einer gegen Membranbruchstücke, intracel-luläre Strukturen und / oder intracellularäre Moleküle fetaler roter Vorläuferzellen immunisierten Maus und /oder anderen Spezies von z.B. Wirbeltieren stammt.

25 In einem weiteren Ausführungsbeispiel wird die weiße buffy-coat-Schicht als Zellfraktion (z.B. 1 – 4 x 10⁷ Zellen) mit einem Antikörper-Cocktail

- aus Antikörpern des polyklonalen Typs bei Raumtemperatur für 20 min lang inkubiert zur Darstellung des Zell-Ansatzes. Der Antikörper-Cocktail mit aus Kaninchen, Schafen oder Pferden angereicherten bzw. isolierten polyklonalen Antikörpern enthält Fluorescein-, Phycoerythrin und / oder Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) markierte Antikörper (20 µl je Antikörper) des polyklonalen Typs mit 0,2 µg Protein / µl Antikörper- Cocktail in PBS mit den oben genannten Zusammensetzungen und die Inkubationsbedingungen erfolgen wie oben bei denen mit monoklonalen Antikörpern.
- 10 Nach der Inkubation mit polyklonalen und / oder monoklonalen Antikörpern werden aus dem Zell-Ansatz mit Hilfe eines Durchflußzytometers (z.B. Typ Becton Dickinson, Vantage SE) unter Verwendung der Durchlicht-, Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften der mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gebundenen fetalen Zellen sowie auch bedingt nach deren Zellgröße und deren vorhandenen Zellkompartimenten mit bis zu 10^5 bis 10^7 -facher Reindarstellung derselben abgetrennt.
- 15

Patentansprüche

5

1. Verfahren zur Anreicherung von fetalen zellkernhaltigen Zellen als Erzeugnis aus peripherem mütterlichem Blut, wobei im

Schritt a) nach einer Entnahme von mütterlichem Blut in Gegenwart von einer Antikoagulation enthaltenden Lösung zur Bereitstellung einer Blutfraktion
10 das Blut mit einer isotonischen Lösung verdünnt sowie

Schritt b) die Blutfraktion zwecks Anreicherung einer Zellfraktion mit zellkernhal-
tigen fetalen Zellen zentrifugiert werden, dadurch gekennzeichnet, dass im

Schritt c) zu der Zellfraktion

ein Antikörper-Cocktail mit Antikörpern des polyklonalen und / oder monoklo-
15 len Typs, welcher

Antikörper Anti-w, die an Antigene der intracellulären Strukturen von weißen
Blutkörperchen und / oder der intracellulären Moleküle von weißen Blutkörper-
perchen und / oder Oberflächen von weißen Blutkörperchen spezifisch bin-
den,

20 und

Antikörper Anti-r, die an Antigene der intracellulären Strukturen von kernhaltigen
Vorläuferzellen roter Blutkörperchen und / oder der intracellulären Moleküle
von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen und / oder der Ober-
flächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch
binden, enthält, zugegeben wird,
25 und man anschließend

Antikörper Anti-i des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs, die an Antigen-i als Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden,

und / oder

- 5 Antikörper Anti i plus des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs, die an intracellulären Strukturen von fetalen Vorläuferzellen und / oder der intracellulären Moleküle von fetalen Vorläuferzellen und / oder Membranbruchstücken von fetalen Vorläuferzellen spezifisch binden, oder Mischungen derselben zugibt, unter Bildung eines Zell-Ansatzes aus Antikörper-Komplexen,

10 sowie

- Schritt d) aus dem Zell-Ansatz fetale Zellen mit an denselben gekoppelten Antikörpern Anti-r und Antikörpern Anti-i und / oder Anti-i-plus aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften, nach den Eigenschaften von Oberflächen und von Zellinnerem sowie der Größenverteilung mit 10^5 bis 10^7 -facher Anreicherung der fetalen Zellen abgetrennt werden.

2. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem mütterlichem Blut nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt c) zu der Zellfraktion der Antikörper-Cocktail aus Antikörpern des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs bei RT für 5 bis 30 min lang zugegeben wird.

- 25 3. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem mütterlichem Blut nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt c) zu der Zellfraktion der Antikörper-Cocktail aus Antikörpern des

polyklonalen und / oder monoklonalen Typs bei RT für 10 bis 20 min lang zugegeben wird.

4. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem
5 mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeich-
net, dass im Schritt d) aus dem Zell-Ansatz fetale Zellen mit an denselben
gekoppelten Antikörpern Anti-r, Antikörpern Anti-i und / oder Antikörpern
Anti-i plus aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften nach den
Eigenschaften von Oberflächen und von Zellinnerem sowie der Größenver-
teilung mit 10^5 bis 10^7 -facher Anreicherung der fetalen Zellen abgetrennt
10 werden.
5. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem
mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeich-
net, dass im Schritt a) venöses und / arterielles mütterliches Blut entnommen
15 wird.
6. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem
mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeich-
net, dass im Schritt a) das Blut mit einer NaCl haltigen Lösung mit einem
20 Puffer von pH 7,2 bis 7,4 verdünnt wird.
7. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem
mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeich-
net, dass im Schritt b) die Blutfraktion bei $800 \times g$ für 0,1 bis 60 min lang
25 zentrifugiert wird.

8. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem mütterlichem Blut nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt b) die Blutfraktion bei $800 \times g$ für 15 bis 60 sec lang zentrifugiert wird.

5

9. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass als Antikörper polyklonale aus Wirbeltieren, vorzugsweise Pferden, Schafen und / oder Kaninchen, verwendet werden.

10

10. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Antikörper monoklonale aus Wirbeltieren, vorzugsweise Mäusen und / oder Ratten, verwendet werden.

15

11. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt d) aus dem Zell-Ansatz mit Hilfe eines Durchfluß-Cytometers fatale mit an der Zelloberfläche gebundenen Antikörper Anti-r und Antikörper Anti-i verbundene fatale Zellen abgetrennt werden.

20

12. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt d) aus dem Zell-Ansatz mit Hilfe eines Durchfluß-Cytometers fatale mit an der Zelloberfläche gebundenen Antikörper Anti-r,

25

Antikörper Anti-i und / oder Antikörpern Anti-i plus verbundene fetale Zellen abgetrennt werden.

13. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem
5 mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekenn-
zeichnet, dass als Antikörper Anti-i ein Antikörper mit einer spezifischen
Bindung an Lacto-N-nor-hexaosylceramid verwendet wird.

14. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem
10 mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekenn-
zeichnet, dass als Antikörper Anti-i ein solcher monoklonaler verwendet
wird, welcher aus B-Lymphocyten eines gegen Lacto-N-nor-
hexaosylceramid des nativen Typs immunisierten Wirbeltieres, vorzugsweise
Maus, Ratte und / oder Kaninchen, bereitgestellt wird.

15. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem
mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekenn-
zeichnet, dass als Antikörper Anti-i ein solcher monoklonaler verwendet
wird, welcher aus B-Lymphocyten eines gegen Lacto-N-nor-
hexaosylceramid des chemisch synthetisierten Typs immunisierten Wirbel-
tieres, vorzugsweise Maus und / oder Ratte, bereitgestellt wird.

16. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem
mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekenn-
zeichnet, dass als Antikörper Anti-i ein polyklonaler verwendet wird, wel-
cher aus Blut von einem gegen Lacto-N-nor-hexaosylceramid des nativen

Typs immunisierten Wirbeltier, vorzugsweise Ratte, Maus und / oder Kaninchen, isoliert wird.

17. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem
5 mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekenn-
zeichnet, dass als Antikörper Anti-i ein polyklonaler verwendet wird, wel-
cher aus Blut von einem gegen Lacto-N-nor-hexaosylceramid des chemisch
synthetisierten Typs immunisierten Wirbeltier, vorzugsweise Maus und / o-
der Ratte, isoliert wird.
10
18. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem
mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekenn-
zeichnet, dass als Antikörper Anti-i plus als monoklonaler ein solcher ver-
wendet wird, welcher aus B-Lymphocyten eines gegen intracelluläre Struk-
turen von fetalen Vorläuferzellen und / oder der intracellulären Moleküle
15 von fetalen Vorläuferzellen und / oder Membranbruchstücke von fetalen
Vorläuferzellen immunisierten Wirbeltieres, vorzugsweise Ratte, Maus und /
oder Kaninchen, bereitgestellt wird.
20 19. Verfahren zur Anreicherung von fetalen Zellen als Erzeugnis aus peripherem
mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekenn-
zeichnet, dass als Antikörper Anti-i plus als polyklonaler ein solcher ver-
wendet wird, welcher aus Blut von einem gegen intracelluläre Strukturen
von fetalen Vorläuferzellen und / oder der intracellulären Moleküle von feta-
25 len Vorläuferzellen- und / oder Membranbruchstücke von fetalen Vorläufer-

zellen immunisierten Wirbeltier, vorzugsweise Maus, Ratte, und / oder Kaninchen, isoliert wird.

20. Verwendung des Erzeugnisses nach einem der Ansprüche 1 bis 19 zur Behandlung von Erbkrankheiten.
5
21. Verwendung des Erzeugnisses nach Anspruch 20 zur Behandlung von Erbkrankheiten im fetalen Alter.
- 10 22. Verwendung des Erzeugnisses nach einem der Ansprüche 1 bis 19 zur Genomuntersuchung.
23. Verwendung des Erzeugnisses nach Anspruch 22 zur Genomuntersuchung von Föten.
15
24. Fetale Zellen aus venösem und / oder arteriellem, mütterlichem Blut, herstellbar, durch im
Schritt a) Verdünnung von nach einer Entnahme von mütterlichem gewonnenem Blut in Gegenwart von einer ein oder mehreren Antikoagulationen enthaltenden isotonischen Lösung zur Bereitstellung einer Blutfraktion sowie
20 Schritt b) Zentrifugation der Blutfraktion zwecks Anreicherung einer Zellfraktion mit zellkernhaltigen fetalen Zellen,
Schritt c) Inkubation der Zellfraktion mit einem Antikörper-Cocktail mit Antikörpern des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs bei RT für 15 bis 30 min, vorzugsweise 10 bis 20 min,
25 lang, welcher

Antikörper Anti-w, die an Antigene der intracellulären Strukturen von weißen Blutkörperchen und / oder der intracellulären Moleküle von weißen Blutkörperchen und / oder Oberflächen von weißen Blutkörperchen spezifisch binden,

5 und

Antikörper Anti-r, die an Antigene der intracellulären Strukturen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen und / oder der intracellulären Moleküle von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen und / oder der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden, enthält,

10 und mit

Antikörpern Anti-i des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs, die an Antigen-i als Antigene der Oberflächen von kernhaltigen Vorläuferzellen roter Blutkörperchen spezifisch binden,

15 und / oder

Antikörpern Anti i plus des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs, die an intracellulären Strukturen von fetalen Vorläuferzellen und / oder der intracellulären Moleküle von fetalen Vorläuferzellen und / oder Membranbruchstücke von fetalen Vorläuferzellen spezifisch binden,

20 unter Bildung eines Zell-Ansatzes aus Antikörper-Komplexen, welche an fetale Zellen gekoppelte Antikörper Anti -r, Anti-i und / oder Anti-i-plus umfassen,

und

Schritt d) Abtrennung der fetalen Zellen mit den an denselben gekoppelten 25 Antikörpern aus dem Zell-Ansatz aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften, nach den Eigenschaften von Oberflächen und von Zellin-

nerem sowie der Größenverteilung mit 10^5 bis 10^7 -facher Anreicherung der fetalen Zellen.

25. Fetales Zellen aus venösem und / oder arteriellem, mütterlichem Blut nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Zugaben des Antikörper-Cocktails, der Antikörper Anti i und / oder der Antikörper Anti plus gleichzeitig oder nacheinander erfolgen.
5
26. Fetales Zellen aus venösem und / oder arteriellem, mütterlichem Blut nach Anspruch 24 oder 25, herstellbar durch im Schritt c) Inkubation der Zellfraktion mit dem Antikörper-Cocktail aus Antikörpern des polyklonalen und / oder monoklonalen Typs bei RT für 10 bis 20 min lang.
10
27. Fetales Zellen aus venösem und / oder arteriellem, mütterlichem Blut nach einem der Ansprüche 24 bis 26, wobei als Antikörper Anti-i ein solcher monoklonaler verwendet wird, welcher
15 aus B-Lymphocyten eines gegen Lacto-N-nor-hexaosylceramid des nativen Typs und / oder deren Derivate des nativen Typs immunisierten Wirbeltieres, vorzugsweise Maus und / oder Ratte, und / oder
aus B-Lymphocyten eines gegen Lacto-N-nor-hexaosylceramid des chemisch synthetisierten Typs und / oder deren Derivate des chemisch synthetisierten Typs immunisierten Wirbeltieres, vorzugsweise Maus und / oder Ratte, hergestellt wird.
20